

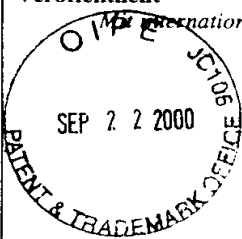
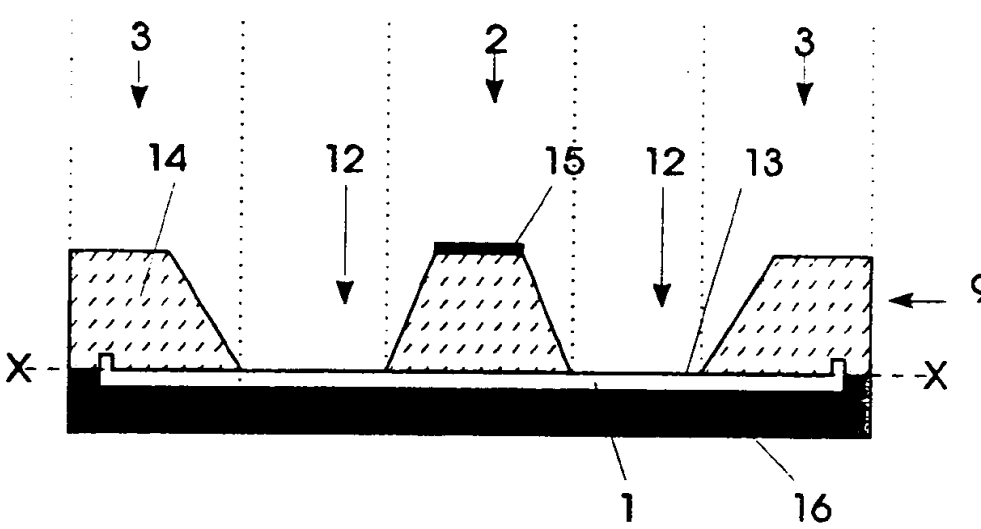
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : B01L 7/00, C12Q 1/68, B01L 3/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/10456
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. April 1996 (11.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03580 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. September 1995 (12.09.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 35 107.0 30. September 1994 (30.09.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOME-TRA BIOMEDIZINISCHE ANALYTIK GMBH [DE/DE]; Rudolf-Wissell-Strasse 30, D-37079 Göttingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAIER, Volker [DE/DE]; Berthold-Brecht-Strasse 9, D-07745 Jena (DE). BODNER, Ulrich [DE/DE]; Am Antonsberg 7, D-37139 Adelebsen (DE). DILLNER, Ulrich [DE/DE]; Naumburgerstrasse 29, D-07743 Jena (DE). KÖHLER, Johann, Michael [DE/DE]; Untergasse 8, D-07751 Golmsdorf (DE). POSER, Siegfried [DE/DE]; Schlippenstrasse 19, D-07749 Jena (DE). SCHIMKAT, Dieter [DE/DE]; Zur Scharfmühle 15, D-37083 Göttingen (DE). (74) Anwälte: PFEIFFER, Rolf-Gerd usw.; Patentanwaltsbüro Pfeiffer & Partner, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Internationaler Recherchebericht. 	
(54) Title: MINIATURIZED FLOW THERMOCYCLER (54) Bezeichnung: MINIATURISIERTER FLUSS-THERMOCYCLER (57) Abstract <p>The invention concerns a miniaturized flow thermocycler for carrying out thermally controlled biochemical or biological molecular processes, in particular polymerase chain reactions. The aim of the invention is to provide a miniaturized thermocycler which enables such reactions to be carried out more effectively, avoids the problem of parasitic heat absorbers and can be manufactured inexpensively in series. This aim is achieved by virtue of the fact that the sample holder (1) is designed as a series of meanders winding in a plane, the sample holder (1) consisting of a groove made in a wall and closed over by a cover, the groove passing alternately through comparable heating zones (2) and cooling zones (3), located at intervals along the groove, as it meanders.</p>			
			

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen miniaturisierten Fluß-Thermocycler zur Durchführung von thermisch kontrollierten, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen, insbesondere von Polymerase-Ketten-Reaktionen. Die Aufgabe der Erfindung, einen miniaturisierten Thermocycler anzugeben, der insbesondere das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion effektiver durchführen läßt, der das Problem parasitärer Wärmekapazitäten umgeht und der sich kostengünstig und serienmäßig herstellen läßt, wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Probenaufnahmebereich (1) in einer Ebene mehrfach mäanderförmig gewunden ausgeführt ist, wobei der Probenaufnahmebereich (1) durch in eine Wandung eingebrachte Gräben gebildet ist, die durch eine Abdeckung verschlossen, und jeweils vergleichbare Grabenabschnitte von voneinander beabstandet angeordneten Heizzonen (2) und Kühlzonen (3) alternierend erfaßt sind.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Miniaturisierter Fluß-Thermocycler

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft einen miniaturisierten Fluß-Thermocycler, der bei thermisch zu kontrollierenden, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen, insbesondere beim Verfahren der sogenannten Polymerase-Ketten-Reaktion, bei dem aus einem Gemisch von DNA-Sequenzen bestimmte Sequenzen vervielfacht werden, Anwendung  
10 findet.

15

Bei der Durchführung von thermisch kontrollierten, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen sind häufig Prozeßschritte mit unterschiedlicher Temperaturbeaufschlagung erforderlich. Von besonderer Bedeutung sind solche wechselnden Temperaturbeaufschlagungen bei der sogenannten Polymerase-Ketten-Reaktion.

20

Das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion ist in den letzten Jahren zur Vervielfachung bestimmter DNA-Sequenzen entwickelt worden und in seinen Grundsätzen von Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. in "Molekulare Zellbiologie, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1994, S. 256/257" ausgeführt. Unter anderem ist bei diesem Verfahren wesentlich, daß Gemische aus DNA-Sequenzen einer definierten Temperaturwechselbehandlung unterworfen werden. Dazu finden stationäre Probenbehandlungsapparaturen Verwendung, bei denen die entsprechenden Proben in Probenkammern eingegeben und periodisch einem Warm-Kalt-Temperaturzyklus unterworfen werden, wobei sich je nach definiert vorgegebenen Primern die jeweils gewünschten DNA-Sequenzen vervielfachen. Die Effektivität bislang bekannter Probenkammern wird dabei als  
25 nicht ausreichend angesehen. Aus diesem Grund ist in jüngster Zeit eine miniaturisierte Probenkammer vorgeschlagen worden (Northrup et al, DNA Amplification with Microfabricated reaction chamber, 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Proc. Transducers 1993, S. 924-26), die eine vierfach schnellere Vervielfachung  
30 gewünschter DNA-Sequenzen gegenüber bekannten Anordnungen ermöglicht. Diese bis zu 50 µl Probenflüssigkeit aufnehmende Probenkammer

35

besteht aus einer strukturierten Siliziumzelle mit einer Längsausdehnung in der Größenordnung von 10 mm, welche in einer Probenangriffsrichtung von einer dünnen Membran abgeschlossen ist, über die die entsprechende Temperaturbeaufschlagung mittels miniaturisierter Heizelemente erfolgt.

5 Auch bei dieser Vorrichtung wird die zu vervielfachende DNA-Sequenz über Mikrokanäle in die Kammer eingebracht, einer Polymerase-Ketten-Reaktion unterworfen und anschließend wieder abgezogen. Trotz der mit dieser Vorrichtung erzielten Vorteile haftet ihr im wesentlichen der Nachteil an, daß auch diese Probenkammer als Ganzes beheizt und

10 gekühlt werden muß, womit sich nur begrenzte Temperaturwechselraten erreichen lassen. Insbesondere bei weiterer Reduzierung der Probengröße fällt dabei die parasitäre Wärmekapazität der Probenkammer und ggf. eines notwendigen Temperierblocks gegenüber der Probenflüssigkeit immer stärker ins Gewicht, so daß die prinzipiell bei kleinen

15 Flüssigkeitsvolumina denkbaren hohen Temperaturwechselraten nicht erreicht werden können, wodurch die Effektivität des Verfahrens relativ gering bleibt. Darüber hinaus ist zwecks Erreichung jeweils konstanter Temperaturregimes für die Probenflüssigkeit ein relativ aufwendiger Steuer- und Regelaufwand erforderlich, wobei die erbrachte Heiz- bzw.

20 Kühlleistung im wesentlichen nicht in der Probenflüssigkeit, sondern in den sie umgebenden Baugruppen verbraucht wird.

Desweiteren ist aus US-PS 5,270,183 ein im Durchflußprinzip arbeitender Thermocycler bekannt geworden, bei dem die zu amplifizierende Probenflüssigkeit durch eine Rohrleitung geschickt wird, welche

25 nacheinander um mehrere, auf unterschiedlichen Temperaturen gehaltene Zylinder ein oder mehrfach aufgewickelt ist. Grundsätzlich sind mit einer solchen Ausbildung auch relativ kleine Probenmengen, bis herunter zu ca. 25 µl, amplifizierbar. Eine derartige Vorrichtung ist in ihrer Handhabung jedoch recht unpraktikabel und erfordert eine hohe Kunstfertigkeit vom

30 Gerätehersteller, so daß sie für eine Serienfertigung gänzlich ungeeignet ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen miniaturisierten Thermocycler anzugeben, der thermisch kontrollierte, biochemische bzw.

35 molekularbiologische Prozesse, insbesondere das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion, effektiver als nach dem Stand der Technik

durchführen läßt, der das Problem parasitärer Wärmekapazitäten umgeht und der sich kostengünstig herstellen läßt.

- Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch die Kennzeichen der Patentansprüche gelöst. Der Erfindung liegt der Gedanke zugrunde, aus der sogenannten Mikrosystemtechnik bekannte Strukturierungstechnologien anzuwenden, um eine Probenaufnahmekammer zu schaffen, die eine dynamische Probenbehandlung auch sehr kleiner Mengen, z.T. sehr teurer, Materialien, ermöglicht.
- Durch die erfindungsgemäße Gestaltung des Probenaufnahmebereiches ist weiterhin gewährleistet, daß die in jeweils vorgesehenen Heiz- und Kühlzonen gerade einer Behandlung unterworfenen Probenteilvolumina einen homogenen Temperaturdurchsatz erfahren, was ebenfalls eine Ausbeuteerhöhung der zu amplifizierenden Substanz bewirkt. Weiterhin wird durch den anordnungsbedingten Wegfall von Heiz- und Kühlprozessen der Wandungsmaterialien und die drastische Minimierung parasitärer Wärmekapazitäten und Wärmeeinflüsse nicht nur ein erheblich geringerer Steuer- und Regelaufwand erforderlich, sondern der Gesamtprozeßdurchlauf erfährt auch eine wesentliche Zeitverkürzung. Dabei braucht jeweils nur soviel Heiz- und Kühlleistung eingespeist zu werden, wie im Probenflüssigkeitsstrom transportiert wird. Darüber hinaus ermöglicht die erfindungsgemäße Thermocyclerausbildung nicht nur eine kontinuierliche Prozeßführung, sondern auch einen seriellen Betrieb, indem unterschiedliche Substanzen nacheinander dem Thermocycler zuführbar sind, ohne daß es zu störenden Vermischungen mit der noch in der Anordnung befindlichen Probe kommen würde, was sich problemlos durch Einbringung eines kleinen Gaspuffervolumens bewerkstelligen läßt. Alle genannten Vorteile gewährleisten ebenso, daß das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion automatisiert durchgeführt werden kann. Weiterhin ergibt sich eine leichte Kombinierbarkeit mit anderen Verfahren, wie z.B. der Mikro-Gel-Elektrophorese, Mikro-Kapillar-Chromatografie und anderen Mikro-Trenn- und Charakterisierungsverfahren.
- Zur näheren Illustration der Erfindung sollen nachfolgende Ausführungsbeispiele dienen. Es zeigen:

Fig. 1 eine Draufsicht auf eine erfindungsgemäße Probenkammer, bei der ein Probenflüssigkeitsweg durch mikrostrukturierte Flußwege gebildet ist und

Fig. 2 einen seitlichen Schnitt durch eine Probenkammer gemäß Fig. 1.

5

In Figur 1 ist eine erfindungsgemäße Probenkammer, bei der ein Probenflüssigkeitsweg durch mikrostrukturierte Flußwege gebildet ist, schematisch dargestellt. Figur 2 zeigt diese Ausbildung nicht maßstäblich im seitlichen Schnitt. Bei dieser Ausführungsform sind in eine ca. 10 · 15 mm große und 500 µm dicke Platte 10, aus Silizium oder Glas bestehend, Gräben 8, die im Beispiel parallel ausgeführt sind, durch naßchemisches Ätzen eingebracht. Ebenso können statt genannter Gräben 8 auch vollständige Durchbrüche vorgesehen sein, wobei der verbleibende Rahmen dann einseitig ganzflächig mit einer geschlossenen Platte zu verschließen wäre. Die offen liegenden Grabenbereiche werden im Beispiel im weiteren von einer Abdeckung 9, die die Baugruppen oberhalb einer Achse X-X, wie in Fig. 4 dargestellt, umfaßt, verschlossen. Die Abdeckung 9 ist dabei in erfindungsgemäßer Weise aus einem Siliziumplättchen gebildet, in das im Beispiel zwei thermisch isolierende Kehlungen 12 eingebracht sind. Diese Kehlungen 12 bilden an ihrer Basis einen membranartigen Abschluß 13, der die Grabenbereiche, die die Verweilzonen der Probenflüssigkeit zwischen Heiz- und Kühlzonen bilden, abdeckt und ca. 1 µm dick ist. In der Figur 2 ist der mittlere Siliziumsteg mit einem Dünnschichtheizelement 15 versehen, mittels dessen die Probenaufheizung an der gegenüberliegenden Stegbasis realisiert wird. Über die im Beispiel verbleibenden zwei äußeren Siliziumstege wird jeweils eine thermostatisierte, nicht näher dargestellte Kühlung vorgenommen. Ein durchgängiger Probenfluß ist im Beispiel durch in die Abdeckung 9 eingebrachte Überbrückungskanäle 11 gewährleistet, die wechselseitig Einzelgrabenanfänge mit den jeweils benachbarten Einzelgrabenenden verbinden. Erforderliche Zu- und Abläufe sind entweder in der Platte 10 (wie in Figur 1 angedeutet) oder die Abdeckung 9 einbringbar. Die beschriebene Gesamtvorrichtung ist im Beispiel mit einem Träger 16 versehen, der aus einem Glas mit niedriger Wärmeleitfähigkeit gefertigt ist. Im Beispiel sind den Einzelgräben 8 Grabenbreiten von 500 µm und Grabenlängen von etwas unter 100 mm bei Grabentiefen von 400 µm

35

gegeben, wodurch sich inclusive der Wege für die Überbrückungskanäle eine Gesamtgrabenlänge von 0,4 m ergibt. Dabei sind sinnvollerweise Probenvolumina von ca. 10 bis 200  $\mu\text{l}$  in den Fluß-Thermocycler einbringbar, was bisher üblichen Probenmengen entspricht. Da durch die  
5 angegebenen Grabendimensionierungen die Möglichkeiten der Mikrolithografie bei weitem noch nicht ausgeschöpft sind, sind für gewünschte Anwendungsfälle auch Dimensionierungen bereits heute herstellbar, die die Einbringung eines Probenvolumens in der Größenordnung von 0,1  $\mu\text{l}$  zulassen würden.

10 Mit dem zu Figur 1 und 2 gehörigen Ausführungsbeispiel sind bei möglichen Flußraten von ca. 0,1  $\mu\text{l/s}$ , bei Probenverweilzeiten in den Heizonenbereichen von ca. 20 sec, in den Kühlzonenbereichen von 30 sec und in den dazwischenliegenden Zonen von 10 sec, bei einer Einzelgrabenanzahl von 40, Gesamtdurchlaufzeiten zur Amplifizierung mit  
15 maximal möglicher Ausbeute von 40 min erreichbar, was eine deutliche Reduzierung unter die bisher bekannt gewordenen geringsten Zeiten bei gleichzeitig erhöhter Ausbeute bedeutet.

In diesem Beispiel kann die Heizzone im Rahmen der Erfindung so ausgebildet sein, daß sie in zwei Teilbereiche derart aufgeteilt ist, daß in  
20 Flußrichtung eine erste Heizzone von bspw. 4 mm Breite entsteht, an die sich eine nicht dargestellte thermische Isolationszone von 1 mm und daran eine zweite Heizzone mit 2 mm Ausdehnung anschließt. Auf diese Weise ist genannte erste Heizzone über Einstellung einer entsprechenden Heizleistung mit einer Temperatur von 72°C und die zweite Heizzone mit  
25 einer Temperatur von 92°C beaufschlagbar. An genannte zweite Heizzone könnte eine zweite thermische Isolationszone von bspw. 1 mm Ausdehnung folgen, an die sich eine Kühlzone von bspw. 3 mm Ausdehnung anschließt, die durch sekundäre Kühlung auf 55°C gehalten wird. Ein derart ausgebildeter miniaturisierter Thermocycler ist besonders  
30 zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion geeignet. Dabei wird am Zulauf ein Gemisch aus Template, Nukleosidtriphosphaten, Primern und taq-Polymerase in Pufferlösung appliziert, deren jeweilige Zusammensetzung analog zum bekannten Stand der Technik festgelegt wird. Die Flußrate wird auf ca. 8  $\mu\text{l/min}$  eingestellt, so daß die  
35 Verweilzeit je Periode etwa 1 Minute beträgt. Davon entfallen auf genannte erste Heizzone 20 sec, 10 sec auf die zweite Heizzone, 15 sec

auf die Kühlzone und jeweils 5 sec auf die thermischen Isolationszonen. Zum Durchlauf des gesamten miniaturisierten Thermocyclers werden damit ca. 40 Minuten benötigt. In dieser Zeit finden in einem Volumenelement von 2 µl vierzig Amplifikationszyklen statt. Bei einer  
5 Verlängerung auf 44 Minuten (10% Zeitverlängerung) werden 34 µl amplifiziert.

Die erfindungsgemäße Probenkammer läßt sich problemlos einer Serienfertigung zuführen und ist kostengünstig, bei gleichzeitig großer  
10 Vielfalt unterschiedlicher Probenkammergeometrien herstellbar, so daß eine Anpassung für variierende Anwendungsfälle keine weiteren Schwierigkeiten mit sich bringt.



Bezugszeichenliste

1	-	Probenaufnahmebereich
2	-	Heizzone
3	-	Kühlzone
6	-	Zulauf
7	-	Ablauf
8	-	Graben
9	-	Abdeckung
10	-	Silizium- oder Glasplättchen
11	-	Überbrückungskanäle
12	-	isolierende Kehlung
13	-	membranartiger Abschluß
14	-	Siliziumsteg
15	-	Dünnschichtheizelement
16	-	Träger
X-X	-	Achse

Patentansprüche

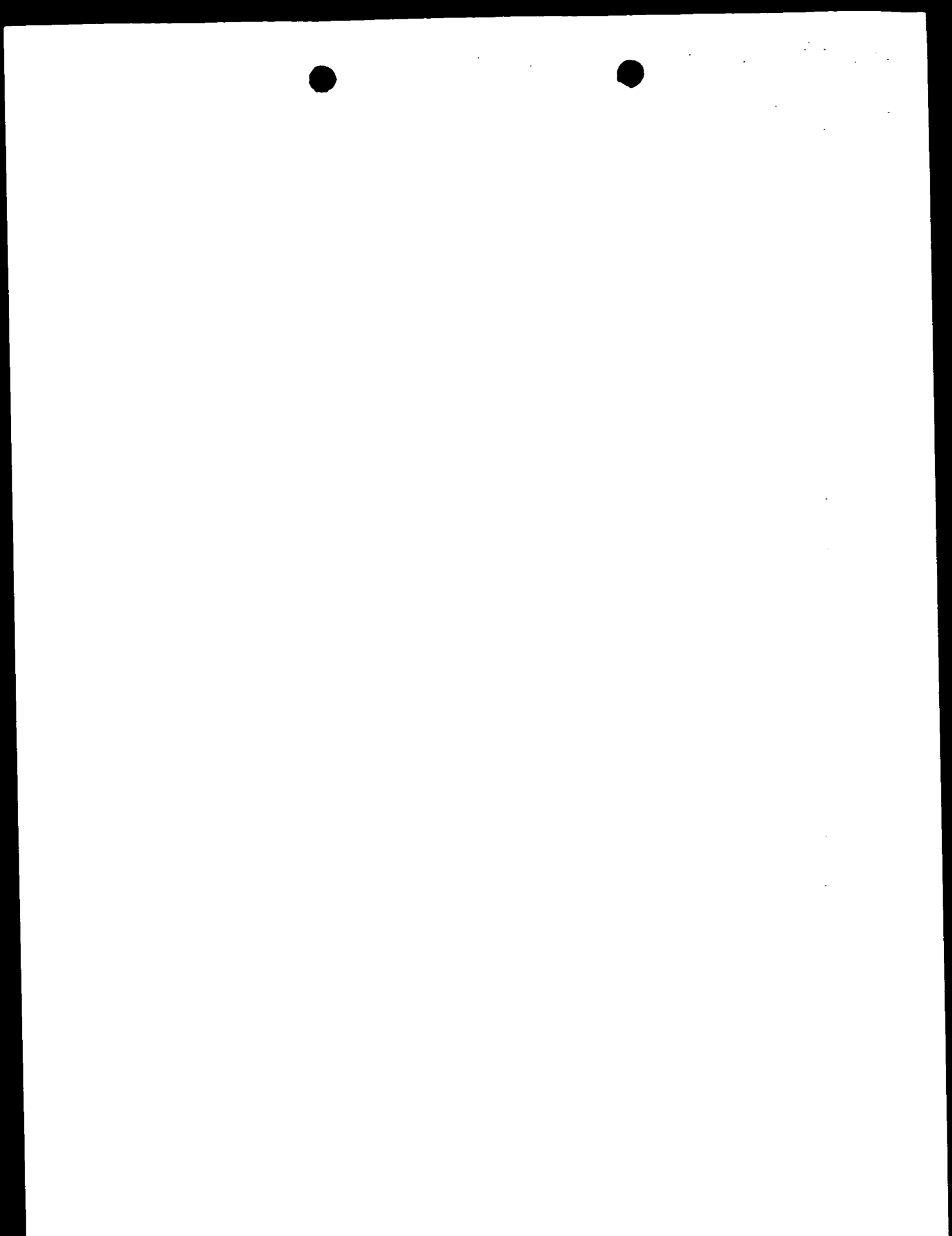
1. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler, einen Probenaufnahmebereich (1)  
5 zur Aufnahme und Durchleitung von flüssigen Medien und wenigstens  
je eine Heizzone (2) und eine Kühlzone (3) beinhaltend, die in  
thermischem Kontakt zum Probenaufnahmebereich stehen, **dadurch**  
**gekennzeichnet**, daß der Probenaufnahmebereich (1) in einer Ebene  
mehrfach mäanderförmig gewunden ausgeführt ist, wobei der  
10 Probenaufnahmebereich (1) durch Gräben gebildet ist, die durch eine  
Abdeckung verschlossen, und jeweils vergleichbare Grabenabschnitte  
von voneinander beabstandet angeordneten Heizzonen (2) und  
Kühlzonen (3) alternierend erfaßt sind.
- 15 2. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß Anspruch 1, **dadurch**  
**gekennzeichnet**, daß genannte Gräben in eine Wandung eingebracht  
sind, die Wandung durch ein Silizium- bzw. Glasplättchen (10) gebildet  
ist, in die die Gräben (8) parallel eingeätzt sind, welche an ihren Enden  
20 untereinander durch Überbrückungskanäle (11), die vorzugsweise in  
eine die Gräben verschließende Abdeckung (9) eingebracht sind, in  
eine durchgehende Verbindung gebracht sind, wobei einerseits der  
durch die Gräben (8) und andererseits die Überbrückungskanäle (11)  
gebildete Flußweg von mindestens je einer Heizzone (2) und einer  
25 Kühlzone (3) erfaßt ist.
3. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß Anspruch 2, **dadurch**  
**gekennzeichnet**, daß genannte Abdeckung (9) selbst aus einem  
30 Siliziumplättchen gefertigt ist, dem probenflußabseitig zwischen  
Heizzonen- und Kühlzonenbereichen wenigstens eine thermisch  
isolierende Kehlung (12) gegeben ist, die in Richtung der Gräben (8)  
einen membranartigen Abschluß (13) bildet.

4. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß genannte Heizzone(n) (2) oder Kühlzone(n) (3) in Probendurchflußrichtung größenordnungsmäßig jeweils gleich lange Probendurchflußabschnitte erfassen.

5

5. Miniaturisierter Fluß-Thermocycler gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zumindest die Heizzone(n) (2) in voneinander beabstandete Bereiche aufteilbar ist (sind), die mit unterschiedlichen Temperaturen beaufschlagbar sind.

10



1 / 1

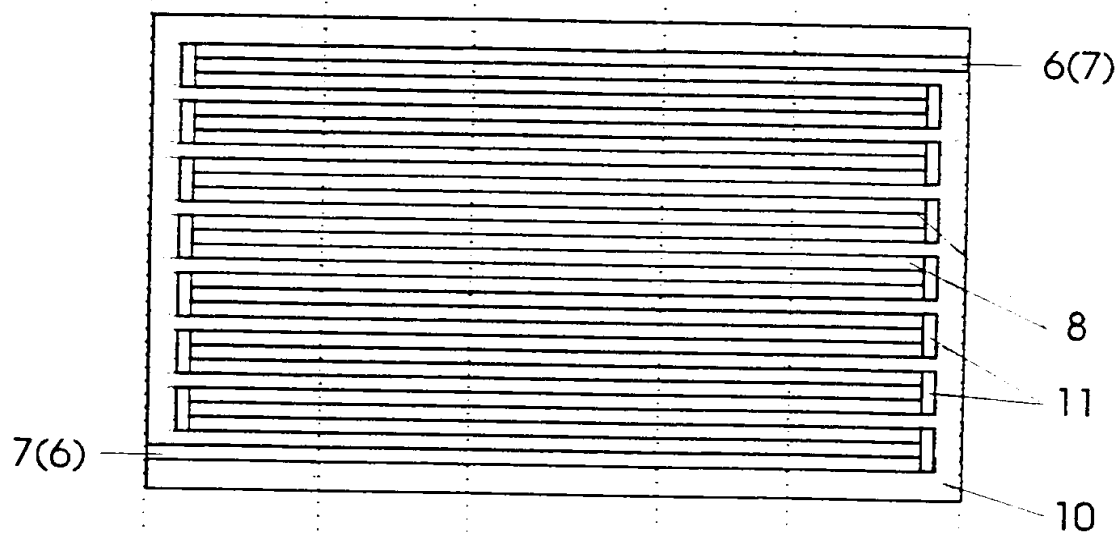


Fig. 1

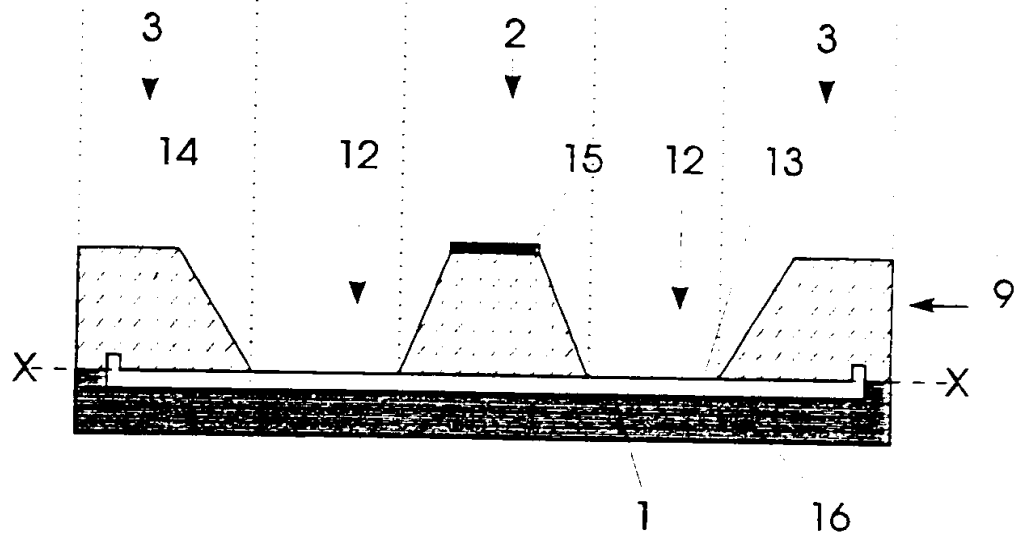
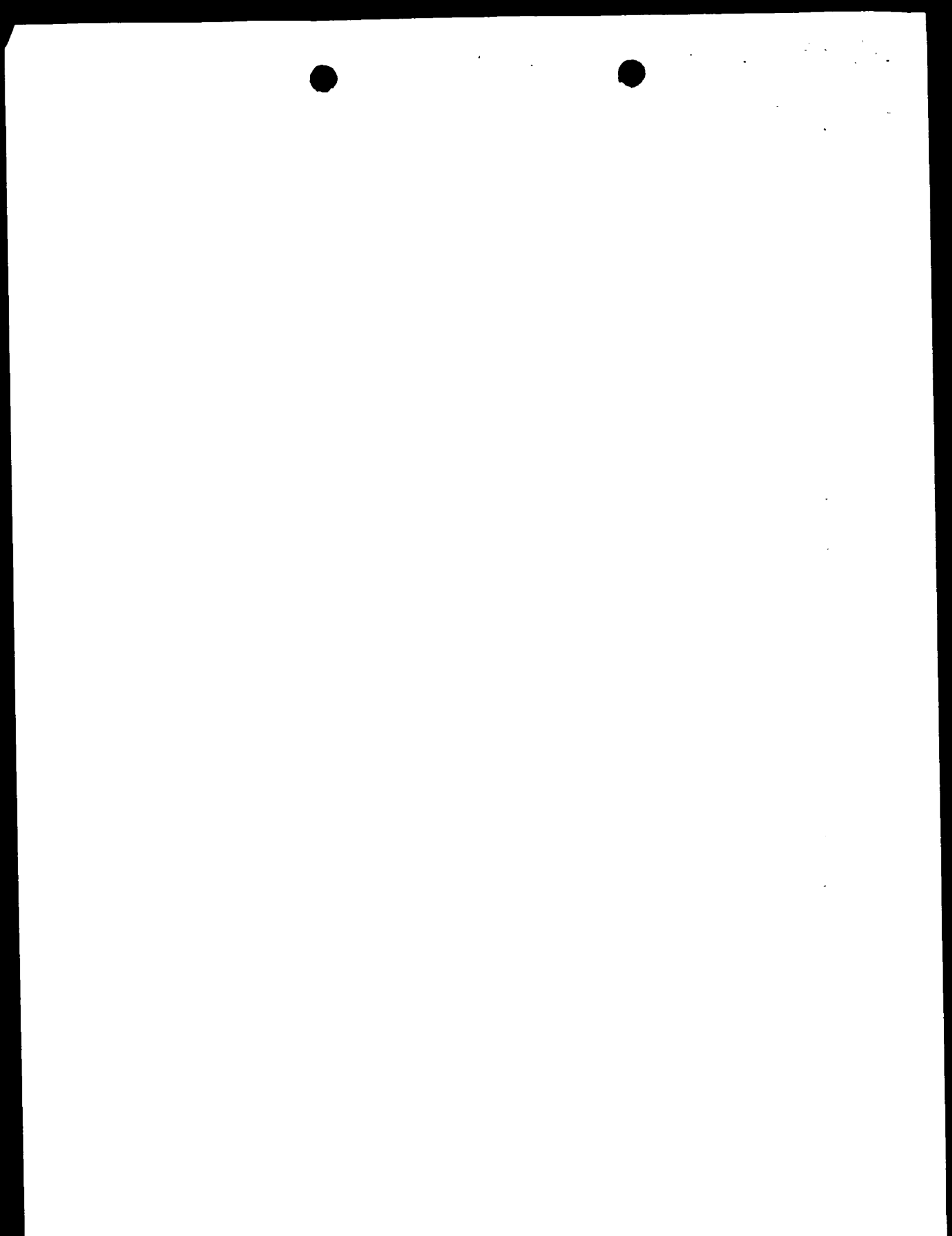


Fig. 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/03580

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01L7/00 C12Q1/68 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,91 16966 (PHARMACIA BIOSENSOR) 14 November 1991	1
A	see page 12, line 14 - page 13, line 2 see page 10, line 25 - line 29; figures 1,2,4-6 see page 10, line 4 - line 8 ---	2
Y	WO,A,92 13967 (BEKMAN RESEARCH INSTITUTE) 20 August 1992	1
A	cited in the application see page 14, line 1 - line 11; figure 1 ---	4,5
A	FR,A,2 650 657 (LARZUL) 8 February 1991 see page 6, line 5 - line 30; figures 1A-C ---	1,4,5
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1995

Date of mailing of the international search report

20. 12. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hocquet, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 95/03580

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 22058 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11 November 1993 see page 17, paragraph 1	1,2
A	see page 19, paragraph 2	3
A	see page 22, last paragraph - page 23, paragraph 1	5
A	----- WO,A,94 05414 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17 March 1994 see page 3, line 5 - line 33 see page 5, line 19 - line 30 see page 17, line 3 - line 27; figures 1,2 -----	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/03580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116966	14-11-91	SE-B- 470347	31-01-94
		EP-A- 0527905	24-02-93
		SE-A- 9001699	11-11-91
		US-A- 5376252	27-12-94
-----			
WO-A-9213967	20-08-92	US-A- 5270183	14-12-93
		AU-B- 660652	06-07-95
		AU-B- 1185092	07-09-92
-----			
FR-A-2650657	08-02-91	AU-B- 643225	11-11-93
		AU-B- 6014890	07-02-91
		BE-A- 1004524	08-12-92
		CH-A- 681431	31-03-93
		DE-A- 4024714	07-02-91
		GB-A, B 2238005	22-05-91
		GR-B- 1000653	25-09-92
		HK-A- 33194	22-04-94
		IT-B- 1243976	28-06-94
		JP-A- 3083572	09-04-91
		LU-A- 87782	11-12-90
		NL-A- 9001772	01-03-91
		SG-A- 25494	10-06-94
		US-A- 5176203	05-01-93
		-----	
WO-A-9322058	11-11-93	US-A- 5304487	19-04-94
		US-A- 5296375	22-03-94
		AU-B- 4222393	29-11-93
		AU-B- 4222593	29-11-93
		AU-B- 4222693	29-11-93
		AU-B- 4222793	29-11-93
		AU-B- 4223593	29-11-93
		CA-A- 2134474	11-11-93
		CA-A- 2134475	11-11-93
		CA-A- 2134476	11-11-93
		CA-A- 2134478	11-11-93
		EP-A- 0637996	15-02-95
		EP-A- 0637997	15-02-95
		EP-A- 0639223	22-02-95
		EP-A- 0637998	15-02-95
		EP-A- 0637999	15-02-95

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/03580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9322058		JP-T- 7506430	13-07-95
		JP-T- 7506431	13-07-95
		JP-T- 7506256	13-07-95
		JP-T- 7506257	13-07-95
		JP-T- 7506258	13-07-95
		WO-A- 9322053	11-11-93
		WO-A- 9322054	11-11-93
		WO-A- 9322421	11-11-93
		WO-A- 9322055	11-11-93
		US-A- 5427946	27-06-95
-----			
WO-A-9405414	17-03-94	AU-B- 5092193	29-03-94
		JP-T- 7508928	05-10-95
-----			

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 B01L7/00 C12Q1/68 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 6 B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y.	WO,A,91 16966 (PHARMACIA BIOSENSOR) 14.November 1991 siehe Seite 12, Zeile 14 - Seite 13, Zeile 2	1
A	siehe Seite 10, Zeile 25 - Zeile 29; Abbildungen 1,2,4-6 siehe Seite 10, Zeile 4 - Zeile 8	2
Y	WO,A,92 13967 (BEKMAN RESEARCH INSTITUTE) 20.August 1992 in der Anmeldung erwähnt	1
A	siehe Seite 14, Zeile 1 - Zeile 11; Abbildung 1	4,5
A	FR,A,2 650 657 (LARZUL) 8.Februar 1991 siehe Seite 6, Zeile 5 - Zeile 30; Abbildungen 1A-C	1,4,5
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabeliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17.November 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20.12.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hocquet, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,93 22058 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11.November 1993 siehe Seite 17, Absatz 1	1,2
A	siehe Seite 19, Absatz 2	3
A	siehe Seite 22, letzter Absatz - Seite 23, Absatz 1 ---	5
A	WO,A,94 05414 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17.März 1994 siehe Seite 3, Zeile 5 - Zeile 33 siehe Seite 5, Zeile 19 - Zeile 30 siehe Seite 17, Zeile 3 - Zeile 27; Abbildungen 1,2 -----	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03580

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9116966	14-11-91	SE-B- 470347	31-01-94
		EP-A- 0527905	24-02-93
		SE-A- 9001699	11-11-91
		US-A- 5376252	27-12-94
-----			
WO-A-9213967	20-08-92	US-A- 5270183	14-12-93
		AU-B- 660652	06-07-95
		AU-B- 1185092	07-09-92
-----			
FR-A-2650657	08-02-91	AU-B- 643225	11-11-93
		AU-B- 6014890	07-02-91
		BE-A- 1004524	08-12-92
		CH-A- 681431	31-03-93
		DE-A- 4024714	07-02-91
		GB-A, B 2238005	22-05-91
		GR-B- 1000653	25-09-92
		HK-A- 33194	22-04-94
		IT-B- 1243976	28-06-94
		JP-A- 3083572	09-04-91
		LU-A- 87782	11-12-90
		NL-A- 9001772	01-03-91
		SG-A- 25494	10-06-94
		US-A- 5176203	05-01-93
-----			
WO-A-9322058	11-11-93	US-A- 5304487	19-04-94
		US-A- 5296375	22-03-94
		AU-B- 4222393	29-11-93
		AU-B- 4222593	29-11-93
		AU-B- 4222693	29-11-93
		AU-B- 4222793	29-11-93
		AU-B- 4223593	29-11-93
		CA-A- 2134474	11-11-93
		CA-A- 2134475	11-11-93
		CA-A- 2134476	11-11-93
		CA-A- 2134478	11-11-93
		EP-A- 0637996	15-02-95
		EP-A- 0637997	15-02-95
		EP-A- 0639223	22-02-95
		EP-A- 0637998	15-02-95
		EP-A- 0637999	15-02-95

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inventar Aktenzeichen

PCT/EP 95/03580

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9322058		JP-T- 7506430	13-07-95
		JP-T- 7506431	13-07-95
		JP-T- 7506256	13-07-95
		JP-T- 7506257	13-07-95
		JP-T- 7506258	13-07-95
		WO-A- 9322053	11-11-93
		WO-A- 9322054	11-11-93
		WO-A- 9322421	11-11-93
		WO-A- 9322055	11-11-93
		US-A- 5427946	27-06-95
-----			
WO-A-9405414	17-03-94	AU-B- 5092193	29-03-94
		JP-T- 7508928	05-10-95
-----			